

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 : <b>C12N 15/22, C07K 14/565, A61K 38/21</b>		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 98/48018</b>
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: <b>29. Oktober 1998 (29.10.98)</b>
(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/EP98/02238</b>		(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: <b>16. April 1998 (16.04.98)</b>		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>	
(30) Prioritätsdaten: 197 17 864.2 23. April 1997 (23.04.97) DE			
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E.V. [DE/DE]; Leonrodstrasse 54, D-80636 München (DE).			
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHNEIDER-FRESENIUS, Christian [DE/DE]; Rembrandtstrasse 5, D-30177 Hannover (DE). OTTO, Bernd [DE/DE]; Halberstadtweg 9, D-30659 Hannover (DE). WASCHÜTZA, Gero [DE/DE]; Höfen 8, D-38536 Meinersen (DE).			
(74) Anwalt: PFENNING, MEINIG & PARTNER GBR; Mozartstrasse 17, D-80336 München (DE).			

(54) Title: RECOMBINANT HUMAN BETA INTERFERON WITH ENHANCED SOLUBILITY

(54) Bezeichnung: HUMANES, REKOMBINANTES INTERFERON- $\beta$  MIT VERBESSERTER LÖSLICHKEIT

(57) Abstract

The invention relates to variants of recombinant human beta interferon and to a method for the production thereof, wherein at least one of the following amino acids Leu (5), Phe(8), Phe(15), Leu(47), Phe(50), Leu(106), Phe(111), Leu(116), Leu(120) and Phe(156) are exchanged with hydrophilic amino acid with a hydroxy group, specially serine, tyrosine or threonine, resulting in enhanced hydrophilic property of the protein surface.

(57) Zusammenfassung

Es werden Varianten des rekombinanten humanen Interferon- $\beta$  sowie ein Verfahren zu seiner Herstellung vorgeschlagen, bei denen mindestens eine der folgenden Aminosäuren Leu(5), Phe(8), Phe(15), Leu(47), Phe(50), Leu(106), Phe(111), Leu(116), Leu(120) sowie Phe(156) gegen hydrophile Aminosäuren mit einer Hydroxygruppe, insbesonders Serin, Tyrosin oder Threonin, ausgetauscht sind, wodurch die Hydrophilie der Oberfläche des Proteins erhöht wird.

Met Ser Tyr Asn Xaa Leu Gly Xaa Leu Gln Arg Ser Ser Asn Xaa Gln  
1 5 10 15  
Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu  
20 25 30  
Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Xaa Gln  
35 40 45  
Gln Xaa Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln  
50 55 60  
Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn  
65 70 75 80  
Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn  
85 90 95  
His Leu Lys Thr Val Leu Glu Lys Xaa Glu Lys Glu Asp Xaa Thr  
100 105 110  
Arg Gly Lys Xaa Met Ser Ser Xaa His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg  
115 120 125  
Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr  
130 135 140  
Ile Val Arg Val Glu Ile Xaa Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu  
145 150 155 160  
Thr Gly Tyr Leu Arg Asn  
165

**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LJ	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Humanes, rekombinantes Interferon- $\beta$   
mit verbesserter Löslichkeit

Die Erfindung betrifft Varianten des humanen, rekombinanten Interferon- $\beta$  mit verbesserter Löslichkeit.

Interferon- $\beta$  ist ein regulatorisches Protein, das durch Rezeptorbindung zur Aktivierung von Genen führt. Dadurch werden in der Zelle antivirale, antiproliferative sowie weitere biologische Aktivitäten vermittelt.

Interferone gehören, wie die Interleukine, zur Klasse der Cytokine und gliedern sich in unterschiedliche Klassen:

Interferon Typ I ( $-\alpha, -\beta, -\omega, -\tau$ ) und Typ II ( $-\gamma$ )

Humanes Interferon- $\beta$  ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von 22 kDa und 166 Aminosäure-Resten. Es

wird hauptsächlich in Fibroblasten bei Virusbefall gebildet und besitzt antivirale, antiproliferative sowie weitere biologische Aktivitäten. Die Aminosäuresequenz des humanen Interferon- $\beta$  wurde erstmals von Taniguchi et al. (1980), Gene Bd. 10, Seiten 11 bis 15, veröffentlicht und ist in Fig. 1 dargestellt.

Gentechnologisch erzeugtes Interferon- $\beta$  aus Bakterien- oder Säugerzellen wird erfolgreich bei der Behandlung der Multiplen Sklerose eingesetzt, einer bislang unheilbaren Krankheit mit großem Patientenkollektiv. Als problematisch für die Produktion und Aufarbeitung des rekombinanten humanen Interferon- $\beta$  erweist sich jedoch die sehr hohe Hydrophobizität des Proteins, die eine sehr schlechte Löslichkeit des rekombinanten humanen Interferon- $\beta$  verursacht.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, Varianten des rekombinanten humanen Interferon- $\beta$  zur Verfügung zu stellen, deren Löslichkeit in polaren Medien wie beispielsweise wässrigen Flüssigkeiten verbessert ist. Weiterhin ist es Ziel dieser Erfindung, Herstellungsverfahren für und Möglichkeiten der Verwendung von Varianten des rekombinanten humanen Interferon- $\beta$  mit erhöhter Löslichkeit in polaren Medien wie wässrigen Flüssigkeiten anzugeben.

Diese Aufgabe wird durch das rekombinante humane Interferon- $\beta$  gemäß Anspruch 1, seine Verwendung gemäß Anspruch 5 sowie seine Herstellung gemäß Anspruch 6 oder 7 gelöst.

Gemäß Anspruch 1 wird in dem bekannten humanen Interferon- $\beta$  mindestens eine der folgenden zehn hydrophoben Aminosäuren gegen eine hydrophile Aminosäure aus-

getauscht: Leu 5, Phe 8, Phe 15, Leu 47, Phe 50, Leu 106, Phe 111, Leu 116, Leu 120 oder Phe 156. Die Erfindung bezieht sich dabei auf die Einzelmutationen sowie alle möglichen Kombinationen dieser einzelnen Aminosäuren-Austausche.

Die genannten Aminosäuren liegen im wesentlichen an der Oberfläche des humanen Interferon- $\beta$  und nehmen dort einen relativ großen Anteil der Oberfläche ein. Der Austausch dieser Aminosäuren führt daher zu einer überproportional großen Verbesserung des hydrophilen Charakters der Oberfläche des rekombinanten humanen Interferon- $\beta$  und erhöht daher die Löslichkeit dieses Proteins in polaren Medien wie zum Beispiel wässrigen Flüssigkeiten. Das erfindungsgemäße rekombinante humane Interferon- $\beta$  ist aufgrund seiner erhöhten Hydrophilie in der Produktion sowie in der Aufarbeitung zu einem Wirkstoff erheblich einfacher handzuhaben.

Die Produktion der erfindungsgemäßen Varianten des rekombinanten humanen Interferon- $\beta$  erfolgt in allgemein bekannter, herkömmlicher Weise mit Hilfe von Mikroorganismen beispielsweise in einer mit dem Gen für eines der erfindungsgemäßen Proteine versehenen *Escherichia coli* - Kultur. Die Herstellung dieser gentechnisch veränderten Mikroorganismen erfolgt ebenfalls in allgemein bekannter Weise mit Hilfe klassischer gentechnischer Mutageneseverfahren zum Austausch der entsprechenden Aminosäuren gegen hydrophile Aminosäuren, auf deren Darstellung an dieser Stelle daher verzichtet wird.

Die erfindungsgemäßen Proteine finden Anwendung zur Herstellung von Arzneimitteln, beispielsweise gegen Multiple Sklerose, sowie als Feinchemikalie für In

vitro-Versuche oder für Interferonspiegelmessungen. Die verbesserte Hydrophilität dieser Proteine vereinfacht dabei sowohl die Herstellung, den Transport, die Aufbewahrung als auch die Applikation als Arzneimittel oder Feinchemikalie.

Vorteilhafte Weiterbildungen der erfindungsgemäßen Proteine werden in den abhängigen Ansprüchen gegeben.

10 Besonders vorteilhaft ist der Austausch gegen die Aminosäuren Serin, Tyrosin und Threonin, die mit je einer Hydroxygruppe besonders hydrophil sind.

15 Serin eignet sich aufgrund seiner geringen Größe besonders für einen Austausch, da mit ihm besonders geringe sterische Änderungen des Proteins verbunden sind.

20 In Fig. 2 ist die Aminosäuresequenz des nativen rekombinanten humanen Interferon- $\beta$  dargestellt, bei dem die obengenannten zehn Aminosäuren wahlweise gegen Serin ausgetauscht werden. Diese austauschbaren Aminosäuren sind als Xaa dargestellt. Werden diese Aminosäuren ausgetauscht, so wird die Hydrophilität der 25 Oberfläche des rekombinanten humanen Interferon- $\beta$  sehr stark verbessert, während lediglich geringe Beeinträchtigungen der Funktionalität und Wirksamkeit des humanen rekombinanten Interferon- $\beta$  auftreten.

30 Eine besonders vorteilhafte Weiterbildung ist in Fig. 3 dargestellt, wobei hier sämtliche der obengenannten zehn Aminosäuren gegen Serin ausgetauscht wurden, so daß sich eine besonders starke Erhöhung der Hydrophilität der Oberfläche des rekombinanten humanen Interferon- $\beta$  ergibt.

Im folgenden wird ein Beispiel für eine erfindungsgemäße Variante des humanen rekombinanten Interferon- $\beta$  gegeben:

5                   Fig. 1    zeigt das native humane rekombinante Interferon- $\beta$ ,

10                  Fig. 2    zeigt die erfindungsgemäßen Varianten-  
                      des rekombinanten humanen Interferon- $\beta$ ,

15                  Fig. 3    zeigt ein erfindungsgemäßes rekombinantes humanes Interferon- $\beta$ , und

20                  Fig. 4    zeigt Primer für die Mutagenese für  
                      die Herstellung erfindungsgemäßen Interferon- $\beta$ .

Wie bereits oben beschrieben, ist in Fig. 1 das native humane rekombinante Interferon- $\beta$  beschrieben, wie es bereits jetzt mit Hilfe der bekannten molekulärbiologischen und biotechnischen Möglichkeiten hergestellt werden kann.

25                  In Fig. 2 ist die Sequenz des nativen humanen rekombinanten Interferon- $\beta$  dargestellt, wobei mit Xaa diejenigen Aminosäuren bezeichnet wurden, die gegen eine Aminosäure mit mindestens einer Hydroxygruppe, vorteilhafterweise gegen Serin, Tyrosin und/oder Threonin ausgetauscht werden können und dabei ein erfindungsgemäßes rekombinantes humanes Interferon- $\beta$  ergeben, das eine erhöhte Oberflächenhydrophilität besitzt.

Beispielsweise wurden sämtliche zehn Einzelvarianten des Interferon- $\beta$ , bei denen Leu (5), Phe (8), Phe (15), Leu (47), Phe (50), Leu (106), Phe (111), Leu (116), Leu (120) oder Phe (156) gegen Serin ausgetauscht wurde, hergestellt, wobei sich insbesondere die Varianten mit dem Austausch der Aminosäuren Leu (5), Phe (8), Leu (47), Phe (50), Leu (106), Phe (111), Leu (116), Leu (120) gegenüber dem nativen Interferon- $\beta$ , sowie auch diese Varianten der Cys-17-Ser-Variante des humanen Interferon- $\beta$  durch eine vergleichbare biologische Aktivität auszeichnen.

Fig. 3 zeigt ein Beispiel für ein humanes rekombinantes Interferon- $\beta$ , bei dem die folgenden Aminosäuren gegen Serin ausgetauscht wurden:

Leu(5), Phe(8), Phe(15), Leu(47), Phe(50), Leu(106), Phe(111), Leu(116), Leu(120) sowie Phe(156). Bei dieser Variante des rekombinanten humanen Interferon- $\beta$  ergibt sich eine besonders hohe Hydrophilität der Oberfläche des Proteins und damit eine besonders gute Löslichkeit in wässrigen Lösungen.

Beispielsweise zeigt auch die Mehrfachvariante mit Aminosäureaustauschen an den Positionen 47, 50, 106, 111, 116 und 120 eine dem in diesem Beispiel verwendeten Ausgangsprotein Interferon- $\beta$  mit einem Cys17Ser-Austausch entsprechende Aktivität.

Die Herstellung von Organismen mit einem erfindungsgemäß veränderten Gen für humanes rekombinantes Interferon- $\beta$  erfolgt mittels klassischer Mutagenese-Verfahren.

Die Mutagenese erfolgt mittels PCR (Polymerasekettenreaktion). Die Mutationen werden durch synthetische Oligonukleotide eingeführt. Als Templat dient Plasmid-DNA mit dem IFN- $\beta$ -Gen. Bei der hier angewandten PCR-Methode wird das gesamte Plasmid vervielfältigt. Die Selektion der PCR-Fragmente erfolgt durch einen Restriktionsverdau des gesamten PCR-Ansatzes mit dem Enzym DpnI. Dieses Enzym erkennt nur methylierte Schnittstellen. Da in-vitro durch PCR erzeugte Fragmente unmethyliert sind, wird durch DpnI nur die Templat-DNA abgebaut. Im Erfolgsfall bleibt nach dem DpnI-Verdau ein Fragment von der Länge des linearisierten Templates übrig, das die Mutationen trägt. Die erzeugten PCR-Fragmente werden kloniert und sequenziert.

PCR-Ansatz (100 $\mu$ l):	Templat-DNA	10 $\mu$ g
	Primer	je 100 pmol
	Nukleotidmix	200 $\mu$ M je dNTP
	MgSO <sub>4</sub>	2-6 mM
	DNA-Polymerase	2,5 Units

PCR-Protokoll	Dauer	Temperatur
Schritt 1.	4 min	95°C
Schritt 2.	+Enzym	
Schritt 3.	45 sec	95°C
Schritt 4.	1 min	55°C
Schritt 5.	10 min	68°C
		goto 3. (11x)
Schritt 6.	10 min	68°C
Schritt 7.		4°C

Die PCR wurde auf einem Thermocycler PTC-200 (Fa MJ Research) durchgeführt.

Für jede PCR sind zwei Primer notwendig, ein "forward"- und ein "reverse"-Primer. Beide Primer schließen sich direkt aneinander an, binden aber an jeweils unterschiedlichen Strängen und mit entgegengesetzter Orientierung.

In Fig. 4 sind Primer dargestellt, die für die Mutagenese verwendet wurden, damit im Genprodukt, dem erfundungsgemäßen Interferon- $\beta$ , die linksseitig benannte Aminosäure(n) gegen Serin ausgetauscht sind.

Die letzten beiden Primer enthalten als einzige "reverse"-Primer Mutationen. Eine PCR mit diesen Primern führt zusätzlich Mutationen ein, ohne die zuvor eingefügten Mutationen 5/8 bzw. 106/111 wieder aufzuheben. Wird das Wildtypgen als Templat genommen, lassen sich mit den "reverse"-Primern vier Mutationen auf einmal einführen (5-17 bzw. 106-120).

## SEQUENZPROTOKOLL

## (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

## (i) ANMELDER:

- (A) NAME: Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der angewandten Forschung e. V.
- (B) STRASSE: Leonrodstrasse 54
- (C) ORT: München
- (D) BUNDESLAND: Freistaat Bayern
- (E) LAND: Bundesrepublik Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 80636

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Humanes rekombinantes Interferon-beta mit verbesserter Löslichkeit

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 22

## (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Diskette
- (B) COMPUTER: IBM PC-kompatibel
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn (EPA)

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 166 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

## (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Homo sapiens
- (G) ZELLTYP: Fibroblast

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln  
1 5 10 15

Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu  
20 25 30

Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln  
35 40 45

Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln  
50 55 60

Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn  
65 70 75 80

Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn  
85 90 95

His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr  
100 105 110

Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg  
115 120 125

Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr  
130 135 140

Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu  
145 150 155 160

Thr Gly Tyr Leu Arg Asn  
165

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 166 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

## (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

## (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Homo sapiens
- (G) ZELLTYP: Fibroblast

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: spezielles Merkmal
- (B) LAGE: 5
- (C) SONSTIGE ANGABEN: /NOTE= Xaa ist Leu, Ser, Tyr oder Thr

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: spezielles Merkmal
- (B) LAGE: 8
- (C) SONSTIGE ANGABEN: /NOTE= Xaa ist Phe, Ser, Tyr oder Thr

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: spezielles Merkmal
- (B) LAGE: 15
- (C) SONSTIGE ANGABEN: /NOTE= Xaa ist Phe, Ser, Tyr oder Thr

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: spezielles Merkmal
- (B) LAGE: 47
- (C) SONSTIGE ANGABEN: /NOTE= Xaa ist Leu, Ser, Tyr oder Thr

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: spezielles Merkmal
- (B) LAGE: 50
- (C) SONSTIGE ANGABEN: /NOTE= Xaa ist Phe, Ser, Tyr oder Thr

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: spezielles Merkmal
- (B) LAGE: 106
- (C) SONSTIGE ANGABEN: /NOTE= Xaa ist Leu, Ser, Tyr oder Thr

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: spezielles Merkmal
- (B) LAGE: 111
- (C) SONSTIGE ANGABEN: /NOTE= Xaa ist Phe, Ser, Tyr oder Thr

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: spezielles Merkmal
- (B) LAGE: 116
- (C) SONSTIGE ANGABEN: /NOTE= Xaa ist Leu, Ser, Tyr oder Thr

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: spezielles Merkmal
- (B) LAGE: 120
- (C) SONSTIGE ANGABEN: /NOTE= Xaa ist Leu, Ser, Tyr oder Thr

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: spezielles Merkmal
- (B) LAGE: 151
- (C) SONSTIGE ANGABEN: /NOTE= Xaa ist Leu, Ser, Tyr oder Thr

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Ser Tyr Asn Xaa Leu Gly Xaa Leu Gln Arg Ser Ser Asn Xaa Gln  
1 5 10 15

Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu  
20 25 30

Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Xaa Gln  
35 40 45

Gln Xaa Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln  
50 55 60

Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn  
65 70 75 80

Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn  
85 90 95

His Leu Lys Thr Val Leu Glu Lys Xaa Glu Lys Glu Asp Xaa Thr  
100 105 110

Arg Gly Lys Xaa Met Ser Ser Xaa His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg  
115 120 125

Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr  
130 135 140

Ile Val Arg Val Glu Ile Xaa Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu  
145 150 155 160

Thr Gly Tyr Leu Arg Asn  
165

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 166 Aminosäuren
  - (B) ART: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein
- iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
  - (A) ORGANISMUS: Homo sapiens
  - (G) ZELLTYP: Fibroblast

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

```

Met Ser Tyr Asn Ser Leu Gly Ser Leu Gln Arg Ser Ser Asn Ser Gln
1 5 10 15

Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu
20 25 30

Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Ser Gln
35 40 45

Gln Ser Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln
50 55 60

Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn
65 70 75 80

Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn
85 90 95

His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Ser Glu Lys Glu Asp Ser Thr
100 105 110

Arg Gly Lys Ser Met Ser Ser Ser His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg
115 120 125

Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr
130 135 140

Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Ser Ile Asn Arg Leu
145 150 155 160

Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
165

```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4  
 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
 (A) LÄNGE: 25 Basenpaare  
 (B) ART: Nucleinsäure  
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang  
 (D) TOPOLOGIE: Linear  
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA  
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:4:

C TCC CTT GGA TTC CTA CAA AGA AGC

25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5  
 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
 (A) LÄNGE: 25 Basenpaare  
 (B) ART: Nucleinsäure  
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang  
 (D) TOPOLOGIE: Linear  
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA  
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:5:

C TTG CTT GGA TCC CTA CAA AGA AGC

25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6  
 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
 (A) LÄNGE: 28 Basenpaare  
 (B) ART: Nucleinsäure  
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang  
 (D) TOPOLOGIE: Linear  
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA  
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:6:

AGC AGC AAT TCT CAG TCC CAG AAG CTC C

28

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7  
 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
 (A) LÄNGE: 28 Basenpaare  
 (B) ART: Nucleinsäure  
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang  
 (D) TOPOLOGIE: Linear  
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA  
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:7:

AGC AGC AAT TTT CAG TCC CAG AAG CTC C

28

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8  
 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
 (A) LÄNGE: 27 Basenpaare  
 (B) ART: Nucleinsäure  
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang  
 (D) TOPOLOGIE: Linear  
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA  
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:8:

TT AAG CAG TCC CAG CAG TTC CAG AAG G

27

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 27 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: Linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ ID NO:9:

TT AAG CAG CTG CAG CAG TCC CAG AAG G

27

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: Linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ ID NO:10:

GAA GAA AAA TCC GAG AAA GAA GAT TTC ACC

30

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: Linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ ID NO:11:

GAA GAA AAA CTG GAG AAA GAA GAT TCC ACC

30

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 25 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: Linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ ID NO:12:

A AAA TCC ATG AGC AGT CTG CAC CTG

25

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 25 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: Linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ ID NO:13:

A AAA CTC ATG AGC AGT TCC CAC CTG

25

16

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 28 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleinsäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: Linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ ID NO:14:

AC TTT TAC TCC ATT AAC AGA CTT ACA GG

28

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 25 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleinsäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: Linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ ID NO:15:

TT GTA GCT CAT ATG TAA GTA TTT CC

25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 29 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleinsäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: Linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ ID NO:16:

TCT TTG TAG GAA TCC AAG CAA GTT GTA GC

29

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 27 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleinsäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: Linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ ID NO:17:

T CTC CTC AGG GAT GTC AAA GTT CAT CC

27

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 18

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 27 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleinsäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: Linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ ID NO:18:

CAG GAC TGT CTT CAG ATG GTT TAT CTG

27

17

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 19

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 23 Basenpaare  
 (B) ART: Nucleinsäure  
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang  
 (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19:

CC CCT GGT GAA ATC TTC TTT CTC

23

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 20

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 27 Basenpaare  
 (B) ART: Nucleinsäure  
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang  
 (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20:

T TCT TAG GAT TTC CAC TCT GAC TAT GG

27

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 21

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 29 Basenpaare  
 (B) ART: Nucleinsäure  
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang  
 (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 21:

TCT TTG TAG GGA TCC AAG GGA GTT GTA GC

29

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 22

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 26 Basenpaare  
 (B) ART: Nucleinsäure  
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang  
 (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 22:

CC CCT GGT GGA ATC TTC TTT CTC GGA

26

## Patentansprüche

1. Humanes, rekombinantes Interferon- $\beta$ ,  
dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine der Aminosäuren Leu(5),  
5 Phe(8), Phe(15), Leu(47), Phe(50), Leu(106),  
Phe(111), Leu(116), Leu(120), Phe(156) gegen  
Aminosäuren mit mindestens einer Hydroxy-Gruppe  
ausgetauscht ist.
- 10 2. Interferon- $\beta$  nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Aminosäuren mit Hydroxygruppen Serin, Tyrosin und/oder Threonin sind.
- 15 3. Interferon- $\beta$  nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es folgende Aminosäuresequenz enthält:

Met Ser Tyr Asn Xaa Leu Gly Xaa Leu Gln Arg Ser Ser Asn Xaa Gln  
 1 5 10 15

Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu  
 5 20 25 30

Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Xaa Gln  
 35 40 45

10 Gln Xaa Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln  
 50 55 60

Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn  
 65 70 75 80

15 Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn  
 85 90 95

His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Xaa Glu Lys Glu Asp Xaa Thr  
 20 100 105 110

Arg Gly Lys Xaa Met Ser Ser Xaa His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg  
 115 120 125

25 Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr  
 130 135 140

Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Xaa Ile Asn Arg Leu  
 145 150 155 160

30 Thr Gly Tyr Leu Arg Asn  
 165

wobei zumindest eine oder mehrere der Aminosäuren  
 35 Xaa(5), Xaa(8), Xaa(15), Xaa(47), Xaa(50), Xaa(106),  
 Xaa(111), Xaa(116), Xaa(120), Xaa(156), Serin, Tyro-  
 sin oder Theronin sind und für die anderen Aminosäu-  
 ren gilt  
 Xaa(5) ist Leu, Xaa(8) ist Phe,  
 40 Xaa(15) ist Phe, Xaa(47) ist Leu,

Xaa(50) ist Phe, Xaa(106) ist Leu,  
Xaa(111) ist Phe, Xaa(116) ist Leu,  
Xaa(120) ist Leu, Xaa(156) ist Phe.

5 4. Interferon- $\beta$  nach mindestens einem der vorher-  
gehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß  
es die folgende Aminosäuresequenz enthält:

10	Met Ser Tyr Asn Ser Leu Gly Ser Leu Gln Arg Ser Ser Asn Ser Gln 1 5 10 15
15	Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu 20 25 30 Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Ser Gln 35 40 45
20	Gln Ser Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln 50 55 60
25	Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn 65 70 75 80
30	Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn 85 90 95 His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Ser Glu Lys Glu Asp Ser Thr 100 105 110
35	Arg Gly Lys Ser Met Ser Ser Ser His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg 115 120 125 Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr 130 135 140
40	Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Ser Ile Asn Arg Leu 145 150 155 160 Thr Gly Tyr Leu Arg Asn 165

5. Verwendung von Interferon- $\beta$  nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche zur Herstellung eines Arzneimittels, als Feinchemikalie für in-vitro-Versuche oder für Interferonspiegelmessungen.
10. Herstellungsverfahren für ein humanes, rekombinantes Interferon- $\beta$  nach Anspruch 1 unter Verwendung eines Mikroorganismus, der das Gen für rekombinantes humanes Interferon- $\beta$  enthält, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß in ansonsten bekannter Weise in dem Gen für humanes, rekombinantes Interferon- $\beta$  des Organismus der genetische Code für mindestens eine der Aminosäuren Leu(5), Phe(8), Phe(15), Leu(47), Phe(50), Leu(106), Phe(111), Leu(116), Leu(120), Phe(156) gegen einen genetischen Code für Aminosäuren mit mindestens einer Hydroxygruppe, vorzugsweise Serin, Tyrosin oder Threonin, ausgetauscht wird.
15. Herstellungsverfahren für ein humanes, rekombinantes Interferon- $\beta$  nach Anspruch 1 unter Verwendung eines Mikroorganismus,
20. d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß in ansonsten bekannter Weise in das genetische Material des Mikroorganismus das Gen für humanes, rekombinantes Interferon- $\beta$  eingefügt wird, wobei der genetische Code für mindestens eine der Aminosäuren Leu(5), Phe(8), Phe(15), Leu(47), Phe(50), Leu(106), Phe(111), Leu(116), Leu(120), Phe(156) des eingefügten Gens gegen einen genetischen Code für Aminosäuren mit mindestens einer Hydroxygruppe, vorzugsweise Serin, Tyrosin oder Threonin, ausgetauscht ist.
- 25.
- 30.
- 35.

Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln  
1 5 10 15

Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu  
20 25 30

Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln  
35 40 45

Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln  
50 55 60

Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn  
65 70 75 80

Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn  
85 90 95

His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr  
100 105 110

Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg  
115 120 125

Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr  
130 135 140

Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu  
145 150 155 160

Thr-Gly Tyr Leu Arg Asn  
165

Fig. 1

Met Ser Tyr Asn Xaa Leu Gly Xaa Leu Gln Arg Ser Ser Asn Xaa Gln  
1 5 10 15

Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu  
20 25 30

Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Xaa Gln  
35 40 45

Gln Xaa Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln  
50 55 60

Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn  
65 70 75 80

Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn  
85 90 95

His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Xaa Glu Lys Glu Asp Xaa Thr  
100 105 110

Arg Gly Lys Xaa Met Ser Ser Xaa His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg  
115 120 125

Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr  
130 135 140

Ile Val Arg Val Glu Ile Xaa Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu  
145 150 155 160

Thr Gly Tyr Leu Arg Asn  
165

Fig. 2

Met Ser Tyr Asn Ser Leu Gly Ser Leu Gln Arg Ser Ser Asn Ser Gln  
1 5 10 15

Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu  
20 25 30

Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Ser Gln  
35 40 45

Gln Ser Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln  
50 55 60

Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn  
65 70 75 80

Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn  
85 90 95

His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Ser Glu Lys Glu Asp Ser Thr  
100 105 110

Arg Gly Lys Ser Met Ser Ser His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg  
115 120 125

Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr  
130 135 140

Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Ser Ile Asn Arg Leu  
145 150 155 160

Thr Gly Tyr Leu Arg Asn  
165

Fig.3

<b>L5</b>	5'- <u>CTC</u> CTTGGATT CCTACAAAGAAGC-3'	25
<b>F8</b>	5'-CTTGCTTGGAT <u>C</u> CCTACAAAGAAGC-3'	25
<b>F15/C17</b>	5'-AGCAGCAATT <u>C</u> TCAGT <u>CC</u> CAGAAGCTCC-3'	28
<b>C17</b>	5'-AGCAGCAATTTCAGT <u>CC</u> CAGAAGCTCC-3'	28
<b>L47</b>	5'-TTAAC <u>GCAGT</u> <u>CC</u> CAGCAGTTCCAGAAGG-3'	27
<b>F50</b>	5'-TTAAC <u>GCAGT</u> GCAGCAGT <u>CC</u> CAGAAGG-3'	27
<b>L106</b>	5'-GAAGAAAA <u>AT</u> <u>CC</u> GAGAAAGAAGATTCACC-3'	30
<b>F111</b>	5'-GAAGAAAA <u>ACT</u> GGAGAAAGAAGATT <u>CC</u> ACC-3'	30
<b>L116</b>	5'-AAA <u>AT</u> <u>CC</u> ATGAGCAGTCTGCACCTG-3'	25
<b>L120</b>	5'-AAA <u>ACT</u> CATGAGCAGT <u>CC</u> ACCCTG-3'	25
<b>F156</b>	5'-ACTTT <u>ACT</u> <u>CC</u> ATTAACAGACTTACAGG-3'	28
<b>L5/F8Rev</b>	5'-TTGTAGCTCATATGTAAGTATTCC-3'	25
<b>F15/C17Rev</b>	5'-TCTTGTTAGGAATCCAAGCAAGTTGTAGC-3'	29
<b>L47/F50Rev</b>	5'-TCTCCTCAGGGATGTCAAAGTTCATCC-3'	27
<b>L106/F111Rev</b>	5'-CAGGACTGTCTCAGATGGTTATCTG-3'	27
<b>L116/L120Rev</b>	5'-CCCCTGGTGAAATCTTCTTCCTC-3'	23
<b>F156Rev</b>	5'-TTCTTAGGATTCCACTCTGACTATGG-3'	27
<b>L5-C17Rev</b>	5'-TCTTGTTAGGGATCCAAG <u>GG</u> GAGTTGTAGC-3'	29
<b>L106-L120Rev</b>	5'-CCCCTGGTG <u>GA</u> ATCTTCTTC <u>CTCGGA</u> -3'	26

Fig. 4

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 98/02238

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 6 C12N15/22 C07K14/565 A61K38/21

According to International Patent Classification(IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 163 993 A (G.D. SEARLE & CO., LTD.) 11 December 1985 see page 9, line 8 - line 10 see page 16, line 8 see page 37 -----	1

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

29 July 1998

07/08/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Le Cornec, N

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/02238

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP 163993	A 11-12-1985	AU	589560 B	19-10-1989
		AU	4256185 A	28-11-1985
		JP	61056200 A	20-03-1986
		US	4914033 A	03-04-1990
		US	4769233 A	06-09-1988

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 98/02238

A. KLASSEIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 6 C12N15/22 C07K14/565 A61K38/21

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C07K C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0 163 993 A (G.D. SEARLE & CO., LTD.) 11. Dezember 1985 siehe Seite 9, Zeile 8 - Zeile 10 siehe Seite 16, Zeile 8 siehe Seite 37 -----	1

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchebericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung,

eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Rechercheberichts

29. Juli 1998

07/08/1998

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5618 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Le Corne, N

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

nationales Aktenzeichen	
PCT/EP 98/02238	

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 163993 A	11-12-1985	AU 589560 B AU 4256185 A JP 61056200 A US 4914033 A US 4769233 A	19-10-1989 28-11-1985 20-03-1986 03-04-1990 06-09-1988

